JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

دوره سوم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۱
صفحات ۱۴۱-۱۲۹

بررسی اثر عصاره آبی برگ شاتوت بر علائم بیماری پارکینسون و مارکرهای استرس اکسیداتیو درموش صحرایی نر

سیما نصری[۱]، زینب نیکنامی[۱]، سیدعلی ضیائی[۲*]، مهرداد روغنی[۳]، محمد کمالی نژاد[۴]

۱- دانشگاه پیام نور، گروه زیست شناسی، تهران، ایران

۲- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه فارماکولوژی، تهران، ایران

۳- دانشگاه شاهد، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، گروه فیزیولوژی، تهران، ایران

۴- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده داروسازی، گروه فارماکوگنوزی، تهران، ایران

***نویسنده مسئول:** aliziai@sbmu.ac.ir*

چکیده

بیماری پارکینسون یک اختلال تخریب کننده نورونی پیشرونده است. در این بیماری فعالیت نورون‌های دوپامینرژیک جسم سیاه و میزان دوپامین جسم مخطط کاهش می یابد. شواهد زیادی در تاثیر استرس اکسیداتیو به عنوان عامل پاتوژن پیشرفت بیماری پارکینسون وجود دارد. آنزیوتانسین II اکسیدازهای وابسته به NADPH را فعال می کند و سوپراکسیدازها را تولید می کند.

عصاره آبی برگ شاتوت در محیط برون سلولی اثرات مهارکنندگی ACE خوبی از خود نشان می‌دهد. در این مطالعه هدف، بررسی اثرات آنتی اکسیدانی عصاره برگ شاتوت در کنترل علائم بیماری پارکینسون و اثر آن بر مارکرهای استرس اکسیداتیو است. ۴۸ سر موش صحرایی نر به صورت تصادفی به ۴ گروه (۱۲= n) ۱) شم ۲) توکسین ۳) کاپتوپریل ۴) درمان تقسیم شدند. موشها در گروه شم به عنوان شاهد (سالم) استفاده شدند، گروه توکسین ۶- هیدروکسی دوپامین دریافت کردند، گروه درمان، عصاره آبی برگ شاتوت (۱۰ mg/kg) را (روزانه ۶ روز قبل از تزریق نوروتوکسین در جسم سیاه و ۴ و ۲۴ ساعت بعد از آن) به صورت داخل صفاقی (IP) دریافت کردند. در گروه کاپتوپریل به جای عصاره گیاه، از کاپتوپریل (۵ mg/kg) استفاده شد. تست‌های رفتاری سفتی عضلانی، چرخش و همچنین مطالعات بافتی در ۶ موش پس از دو هفته و اکسیداسیون پروتئین‌ها، پراکسیداسیون لیپیدها، اندازه‌گیری آنزیم ACE مغزی در ۶ موش دیگر در همه گروه‌ها ۲۴ ساعت پس از تزریق نوروتوکسین بررسی شدند. نتایج بدست آمده نشان داد که عصاره آبی برگ شاتوت می‌تواند در کاهش علائم بیماری پارکینسون موثر باشد و باعث کاهش مارکرهای استرس اکسیداتیو و مرگ سلولهای دوپامینرژیک شود.

واژه‌های کلیدی: بیماری پارکینسون، دوپامین، برگ شاتوت، اکسیداتیو استرس، ACE

Archive of SID

www.SID.ir

JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

J.Vet.Clin.Res 3(3)129-141, 2012

An investigation into the effect of Morus nigra L. leaf extract on Parkinson's disease symptoms and oxidative stress markers in male rats

Nasri, S.[1], Niknami, Z.[1], Ziai, S.A.[2*], Roghani, M.[3], Kamalinejad, M.[4]

1- Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran

2-Department of pharmacology, School of Medicine, Shahid Beheshti Medical University, Tehran, Iran

3- Department of Physiology, School of Medicine and Medicinal Plant Research Center, Shahed University, Tehran, Iran

4- Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Shahid Beheshti Medical University, Tehran, Iran

**** Corresponding author:*** aliziai@sbmu.ac.ir

Archive of SID

Abstract

Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative disorder. In this disease, decrease activity of dopaminergic neurons in the substantia nigra and dopamine level in the striatum. There is much evidence in effect of oxidative stress as pathogen agents of Parkinson's disease progression. Angiotensin II activates NADPH depending oxidases and produce superoxides formation. Morus nigra L. extract shows good Angiotensin Converting Enzyme (ACE) inhibitory effects, in Vitro. The aim of this study is to study the antioxidant effects of Morus nigra L. leaf extract on Parkinson's disease symptoms and oxidative stress markers. 48 male rats divided randomly into four groups (n=12 each): 1) sham, (2) toxin, (3) captopril, (4) treatment. Rats in sham group were used as normal controls. Rats in toxin group were injected with 6-OHDA. Captopril group were injected i.p. with Captopril (5 mg/kg) daily 6 days before and 4 & 24 hrs after the injection of 6-OHDA and treatment group were injected i.p. with Morus nigra L. (10 mg/kg) extract daily 6 days before the injection of 6-OHDA in the substantia nigra and 4 & 24 hrs after it. Muscle stiffness, rotation test and histological test were assessed in 6 rats of any groups after 2 weeks. Protein oxidation, lipid peroxidation and ACE activity were assessed in brain in 6 rats of any groups 24 hrs, after the 6-OHDA injection. The results suggested that the use of aqueous extract of Morus nigra can be useful in reduction of Parkinson's disease symptoms and reduce oxidative stress markers and dopaminergic neuronal death.

Key words: Parkinson's disease, Dopamine, Morus nigra, oxidative stress, ACE

www.SID.ir

مقدمه

آسیب اکسیداتیو و تولید رادیکال‌های آزاد خصوصاً گونه‌های رادیکال فعال اکسیژن و نیتریک اکساید باعث از بین رفتن سلول‌های عصبی مغز شده و در برخی بیماری‌ها مثل پارکینسون و آلزایمر این مسئله به عنوان یکی از دلایل پیدایش بیماری مطرح است (۲۳). رادیکال‌های آزاد حاوی اکسیژن که تحت عنوان گونه‌های اکسیژن واکنشی یا ROS (Reactive oxygen species) نامیده می‌شوند، مهم ترین رادیکال‌های آزاد بیولوژیک هستند. گونه‌های اکسیژن واکنشی شامل رادیکال‌های سوپر اکسید و رادیکال هیدروکسیل، باضافه مشتقات اکسیژن با الکترون‌های نابرابر مانند پراکسید هیدروژن، آنیون سوپراکسید و اسید هیپوکلریت هستند (۲۰).

آنزیم مبدل آنژیوتانسین یا ACE (Angiotensin Converting Enzyme)، آنزیم اصلی در سیستم رنین- آنژیوتانسین محسوب می‌شود و اگزوپپتیدازی است که باعث تبدیل آنژیوتانسین I به II می‌شود. آنژیوتانسین II باعث فعال شدن اکسیدازهای وابسته به NADPH می شوند که سوپراکسایدها را تولید می کنند و این اکسیدازها در بیماری‌هایی مانند فشار خون، دیابت و آترواسکلروزیس دیده می‌شوند (۹). بنابراین آنژیوتانسین II می تواند با تولید ROS از طریق گیرنده‌های AT1 باعث تخریب اعصاب دوپامینی شود و دستکاری اجزاء سیستم رنین آنژیوتانسین (RAS) جهت درمان بیماران پارکینسونی قابل توجه است (۱۶).

اثرات مفید داروهای مهار کننده آنزیم مبدل آنژیوتنسین I به آنژیوتنسین II، مانند کاپتوپریل، در درمان بیماران پارکینسونی مورد توجه قرار گرفته است. اثر حفاظت نورونی مهارگرهای ACE در برابر نوروتوکسینهای MPTP و ۶- هیدروکسی دوپامین در جوندگان اثبات شده است (۲۵). در مطالعه ای، تزریق زیر جلدی کاپتوپریل به مدت ۹ روز به موش‌هایی که توسط ۶- هیدروکسی دوپامین دچار پارکینسون شده بودند باعث اثر محافظت کنندگی عصبی و کاهش استرس اکسیداتیو در قسمت مغز میانی و جسم مخطط شد (۱۳).

در مطالعه‌ای که به منظور شناسایی گیاهان دارویی مورد استفاده در طب سنتی از نظر قدرت مهارکنندگی فعالیت ACEصورت گرفت ۱۳۵ گیاه مورد مصرف در درمان فشار خون مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه برگ گیاه شاتوت خاصیت مهارکنندگی ACE زیادی از خود نشان داد (۲۴). برگ شاتوت با نام علمی *Morus nigra* L. گیاهی است از تیره Moraceae که سابقه طولانی مدتی از مصارف درمانی دارد.

هدف از این مطالعه بررسی خاصیت ضد پارکینسونی عصاره‌ی آبی برگ گیاه شاتوت در مدل پارکینسونی حاصل از 6-OHDA در موش صحرایی نر است. عصاره برگ گیاه شاتوت با خاصیت مهارکنندگی ACE (۲۴) و در نتیجه جلوگیری از روند استرس اکسیداتیو می تواند باعث جلوگیری از بیماری پارکینسون القا شده در موش‌های صحرایی شود.

مواد و روش کار

در این پژوهش از ۴۸ موش صحرایی نر نژاد Wistar با محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم، استفاده شد. در مجموع، موش‌های صحرایی سالم به صورت تصادفی به ۴ گروه تقسیم شدند:

گروه شاهد (n=12) (بدون ایجاد ضایعه) که به آنها μl ۵ محلول نرمال سالین ۰/۹% حاوی μl ۰/۱ اسید آسکوربیک ۰/۲% داخل جسم سیاه (در ناحیه چپ) تزریق شد (۶).

گروه نوروتوکسین(n=12) که جسم سیاه آن‌ها تخریب شد. نوروتوکسین در جسم سیاه نیمکره چپ تزریق شد. این گروه μl ۵، از محلول نرمال سالین ۰/۹% حاوی g μ ۸ نوروتوکسین ۶- هیدروکسی دوپامین (خریداری شده از شرکت Sigma امریکا) و μl ۰/۱ اسید آسکوربیک ۰/۲ % را با سرعت μl / min ۱ دریافت نمودند (۶).

گروه درمان (n=12) که mg/kg ۱۰ عصاره برگ شاتوت

Archive of SID

www.SID.ir

محلول در ml ۱ نرمال سالین ۰/۹% را به ترتیب در زمان‌های ۱۴۴، ۱۲۰، ۹۶، ۷۲، ۴۸، ۲۴ و ۲ ساعت قبل از تزریق نوروتوکسین ۶- هیدروکسی دوپامین و در ادامه در ساعت‌های ۴و ۲۴ ساعت بعد از تزریق آن، به صورت درون صفاقی دریافت نمودند. نوروتوکسین داخل جسم سیاه (در ناحیه چپ) تزریق شد (۱۲).

گروه کاپتوپریل(n=12) که از mg/kg ۵ کاپتوپریل محلول در ml ۰/۵ نرمال سالین ۰/۹%، همانند گروه درمان، به ترتیب در زمان‌های ۱۴۴، ۱۲۰، ۹۶، ۷۲، ۴۸، ۲۴ و ۲ ساعت قبل از تزریق نوروتوکسین ۶- هیدروکسی دوپامین و در ادامه در ساعت‌های ۴و ۲۴ ساعت بعد از تزریق آن، به صورت درون صفاقی به عنوان کنترل مثبت جهت درمان استفاده شد (۱۲).

از گروه‌های ۱۲تایی، ۶ موش برای تست رفتاری و مطالعات بافت شناسی دو هفته بعد از تزریق سم و ۶ موش برای اکسیداسیون پروتئین‌ها و پراکسیداسیون لیپیدها و اندازه‌گیری آنزیم ACE بافت مغزی ۲۴ ساعت بعد از تزریق سم، استفاده شد.

روش عصاره گیری برگ گیاه شاتوت: برگ گیاه شاتوت از بازار دارویی خریداری و توسط گیاه شناس گروه فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی مورد تایید قرار گرفت.

عصاره آبی به این ترتیب تهیه شد: مقدارg ۱۰۰ گیاه مورد نظر وزن شده و پس از شستن گیاه، همراه مقدار لازم آب (طوری که سطح گیاه را آب فراگیرد) در یک بشر بزرگ ریخته شده و بر روی هیتر قرار گرفت تا به جوش بیاید، سپس به مدت ۱۵ دقیقه جوشید و پس از آن ابتدا با پارچه تمیز و سپس با کاغذ صافی صاف گردید. صاف شده درون کریستالیزور ریخته شده و بر روی بن ماری خشک گردید. به دلیل طولانی بوده زمان خشک شدن عصاره، در فواصل خشک شدن، عصاره در یخچال نگهداری می‌شد. خشک شدن تا هنگامی ادامه پیدا می‌کند که عصاره وزن ثابتی پیدا کند. پس از تهیه و خشک شدن، درب ظرف عصاره مورد نظر با فویل آلومینیومی پوشانده شده و تا زمان آزمایش در یخچال قرار داده شد. مقدار عصاره بدست آمده از g ۱۰۰ گیاه برای برگ شاتوت حدود g ۸ است. علت تهیه عصاره آبی و عدم تهیه عصاره الکلی این است که برگ شاتوت ترکیبات قندی دارد و در آب بهتر حل می‌شود، همچنین عصاره آبی در طب سنتی استفاده می‌شود.

تعیین دوز درمانی: دوز انتخابی برای عصاره با توجه به گزارش‌های قبلی و آزمایش پایلوت انجام شده mg/kg ۱۰ تعیین شد (۱۱).

روش جراحی و تزریقات: ابتدا موش توزین و سپس با تزریق داخل صفاقی، مخلوطی از mg/kg ۱۰۰ کتامین و mg/kg ۵ گزیلازین بیهوش شد. آنگاه موش در دستگاه استرئوتکس (Stoelting - USA) ثابت شد. با توجه به مختصات استخراج شده از اطلس Watson & Paxinos مختصات نقطهٔ هسته SNC (DV ۸/۳ mm، (چپ) ML ۲ mm، Ap -۴/۸ mm to bregma)، از سطح استخوان جمجمه، جهت ایجاد مدل حیوانی بیماری پارکینسون مشخص شد (۱۹).

تست چرخش القا شده با آپومورفین: ۶ حیوان از هر گروه برای رفتار چرخشی بوسیله تزریق داخل صفاقی داروی آپومورفین هیدروکلراید (mg/kg ۲/۵، محلول در ml ۰/۵ نرمال سالین ۰/۹%)، دو هفته بعد از جراحی در بازه ۶۰ دقیقه ای، آزمایش شدند. در طی این دو هفته هیچ تزریق عصاره‌ای صورت نگرفت. به حیوانات برای عادت اجازه داده شد تا به مدت ۱۰ دقیقه قبل از تزریق و سپس یک دقیقه بعد از تزریق دارو در محفظه استوانه‌ای مدرج شفاف به نور (به قطر cm ۳۳ و ارتفاع cm ۳۵) قرار بگیرند، پس از تزریق دارو تعداد چرخش کامل ۳۶۰ درجه برای ۶۰ دقیقه، در دوره‌های زمانی ۱۰ دقیقه‌ای در یک اتاق کاملاً ایزوله شده به صورت دستی اندازه‌گیری شد. تعداد چرخش کونترولترال (به سمت مخالف محل ضایعه یعنی به سمت راست) به عنوان عدد مثبت و چرخش ایپسی لترال (به سمت چپ یا محل ضایعه) به عنوان عدد منفی درنظر گرفته شد.

www.SID.ir
Archive of SID

تعداد خالص چرخش، پس از تفاضل چرخش‌ها در دو جهت محاسبه شد (۵). این ارزیابی رفتاری دو هفته پس از ایجاد ضایعه برای هر موش تکرار شد و آنالیز رفتاری پس از محاسبه آماری به صورت رفتار چرخش القا شده بر اثر آپومورفین قبل و بعد از جراحی ارائه شد (۱۲).

تست سفتی عضلانی: حیوان را روی میز قرار داده، چنانچه طرز ایستادن و راه رفتن آن طبیعی بود، نمره‌ای دریافت نمی کرد (نمره صفر می‌گرفت). در صورتی که حیوان روی میز قرار گیرد و در اثر سفتی عضلات بی حرکت باقی بماند و یا با زحمت با حرکت دست‌ها و پاها شروع به حرکت کند، به حیوان نمره ۰/۵ داده می شود. دست راست حیوان را روی سکوی چوبی به ارتفاع ۳ سانتی متر قرار داده چنانچه حیوان حداقل ۱۰ ثانیه دست خود را از روی سکو برنمی داشت نمره ۰/۵ دریافت می‌کرد، برای دست چپ نیز به همین ترتیب آزمایش صورت می‌گرفت و اگر حیوان دست خود را برای ۱۰ ثانیه برنمی داشت مجددا نمره ۰/۵ می‌گرفت، این مرحله در مجموع ۱ نمره داشت. دست راست حیوان را بر روی سکوی ۹ سانتی متری قرار داده به طوری که سایر قسمت‌های بدن با سکو تماس نداشته باشد، در صورت نگه داشتن دست خود به مدت ۱۰ ثانیه، نمره ۱ را می‌گرفت و برای دست چپ نیز به همین صورت انجام می‌شد، این مرحله در مجموع ۲ نمره داشت. حیوانی که کاملا دچار بیماری پارکینسون شده بود، نمره‌ی ۳/۵ را دریافت می‌کرد و حیوان سالم نمره صفر را دریافت می‌نمود (۱۵).

۶ موش از هر گروه دو هفته بعد از جراحی تحت این بررسی قرار گرفتند.

اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم ACE در بافت مغز:

برای تست‌های بیو شیمیایی، ۲۴ ساعت پس از جراحی، در ابتدا حیوان با گاز Co2 توسط دستگاه دسیکاتور نیمه بیهوش شده، سپس با گیوتین سر حیوان جدا شده و مغز آن خارج شد. مغزهای جدا شده پس از توزین خیلی سریع در ۸۰- درجه سانتیگراد فریز شدند.

انکوباسیون آنزیم و سوبسترا: انکوباسیون آنزیم و سوبسترا به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای° ۳۷، طبق الگوریتم زیر انجام گرفت:

محلول متوقف کننده μl ۱۵۰ ← سوبسترای Hip-His-leu μl ۴۰ + μl ۱۰ هموژن مغز

محلول متوقف کننده برای انکوباسیون، از دستگاه ترمومیکسر (Comfort MTP) Thermomixer استفاده گردید. اسید هیپوریک حاصل از واکنش آنزیم و سوبسترا به عنوان محصول توسط دستگاه HPLC اندازه گیری شد و فعالیت آنزیم محاسبه شد.

طرز تهیه بلانک به این صورت است که بعد از اضافه کردن نمونه، ابتدا محلول متوقف کننده را اضافه کرده و سپس سوبسترا بر روی آن افزوده شد و تا زمان انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سپری شد. استاندارد مورد استفاده اسید هیپوریک و سوبسترای مورد استفاده Hip-His-Leu بود (۲۴).

کروماتوگرافی مایع با فشار زیاد (HPLC): دستگاه HPLC مورد استفاده متعلق به شرکت Shimadzu و شامل پمپ LC-10ADVP، شناساگر SPD-10AV، سیستم کنترل SCL-10AVP بود. ستون مورد استفاده Bondapak®c18µ به ابعاد mm ۴۶×۲۵۰ و قطر ذرات ۱۰ میکرون بود. هر بار μl ۲۰ از حاصل انکوباسیون توسط سرنگ همیلتون به دستگاه تزریق شد. فاز متحرک (مخلوط ۱:۱ از KH2PO4 ۱۰ میلی مولار و متانول با pH =۳ که با صافی غشایی ۰/۴۵ میکرون صاف شد) با سرعت ml ۱ در دقیقه جریان داشت و کل زمان کروماتوگرام ۸ دقیقه بود . پیک‌ها در طول موج nm ۲۲۸ ردیابی می‌شدند. کروماتوگرام نمونه‌های انکوبه شده متشکل از:

Archive of SID

www.SID.ir

۱- پیک محصول (اسید هیپوریک) با زمان بازداری ۳/۵۵ دقیقه و

۲- پیک سوبسترای تجزیه نشده (هیپوریل هیستیدیل لوسین) با زمان بازداری ۴/۹۵ دقیقه بود، دو پیک از یکدیگر به خوبی فاصله داشته و پیک مزاحمی دیده نشد.

تعیین پراکسیداسیون لیپیدها: مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی بر اساس تشکیل کمپلکس مالون دی آلدئید ایجاد شده با تیو باربیتوریک اسید (TBARS) سنجیده می‌شود. تعیین (TBARS) به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتری صورت می‌گیرد.

روش عمل بدین ترتیب بود که قطعات بافت در سه برابر حجم بافر Na2PO4/KH2PO4 pH=۷/۴ ،که با KCl ایزوتون شده و حاوی هیدروکسی تولوئن بوتیله ۲۰۰ میکرومولار و دفروکسامین ۲۰۰ میکرومولار بود با دستگاه هموژنایزر Tomy Micro Smash مدل MS-100 با دور ۴۰۰۰ rpm به مدت ۱/۵ دقیقه تحت عمل هموژناسیون قرارگرفت. در مرحله بعد ۲۰۰ µl از محلول هموژنایز شده را با ۲۰۰ µl محلول دترژنت SDS (سدیم ۲-دسیل سولفات) ۸ % و ۷۵۰ µl اسید استیک ۲۰%، به مدت ۱ دقیقه در ورتکس قرار داده در مرحله بعد با۷۵۰ µl تیوباربیوتوریک اسید ۰/۸% در ۹۵ درجه به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه کردیم. بعد از رسیدن به دمای آزمایشگاه با ۳ میلی لیتر N- بوتانول مخلوط نموده به شدت تکان داده و در سانتریفوژ با دور ۴۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. در مرحله آخر، جذب نوری مایع فوقانی جدا شده (لایه نارنجی رنگ) در اسپکتروفوتومتر با طول موج ۵۳۲ nm خوانده شد. همه گروه‌ها تحت این بررسی قرار گرفتند (۱۲).

تهیه محلول استاندارد جهت کالیبراسیون و ارزیابی پراکسیداسیون لیپیدها: ۲۴/۷ ماکرولیتر ۱،۱،۳،۳، تترااتوکسی پروپان را با ۱۵ μl H2SO4 (۱/۵ % V/V) و ۶۰/۳ μl آب مقطر مخلوط کرده با حدود ۹۰۰ μl آب مقطر به حجم ۱ ml می رسانیم. محلول به دست آمده ۱۰۰ $M\mu$ خواهد بود و باید چندین مرحله توسط آب مقطر رقیق شود تا ۶ محلول با غلظت‌های ۲۰۰ nM، ۱۰۰ nM، ۵۰ nM، ۱۰ nM، ۵ nM، ۱ nM، به دست آید که به عنوان استاندارد استفاده می شوند و با همان طول موج ۵۳۲ nm طیف جذبی این ۶ محلول اندازه گیری شده و منحنی استاندارد آن رسم می شود (۱۲).

ارزیابی اکسیداسیون پروتئین ها: اکسیداسیون پروتئین‌ها از طریق تعیین اجزاء کربونیل پروتئین اندازه گیری می‌شود. اجزاء کربونیل پروتئین‌ها به روش اسپکتروفتومتری اندازه گیری می‌شود. عمل هموژنیزاسیون مانند فرایند ارزیابی پراکسیداسیون لیپیدها انجام شد. یک قسمت از هموژن را برای رسوب اسید نوکلئیک بایک قسمت استرپتومایسین۱% مجاور نموده سپس در دور ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کردیم. محلول فوقانی همراه با تری کلرواستیک اسید ۱ M به مدت ۲۰ دقیقه توسط دستگاه سونیکیتور (Ulterasonic System Tecna 3) سونیکیت شد و در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ نموده، قسمت رسوب داده شده (Pellet) را با ۲۰۰ µl NaOH ۰/۵ مولار ۳ دقیقه ورتکس کرده تا حل شد. ۸۰۰ µl از ۱۰ mM Dinitrophenyl Hydrazine 2-4 در اسیدکلریدریک ۲ M به آن اضافه شد، در مرحله بعد به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی قرار گرفت. سپس محلول با ۲۰۰ µl تری کلرواستیک اسید ۱ M به مدت ۲ دقیقه مجاور و بعد سانتریفوژ شد. رسوب با ۵۰۰ میکرولیتر محلول اتیل استات: اتانول (۱:۱ V/V) شستشو داده شد. ۸۰۰ میکرولیتر گوانیدین ۶ M (محلول در ۲۰ mM KH2po4 pH=۲/۴) را به هر لوله حاوی رسوب اضافه نموده پس از حل شدن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر، (Cecil CE مدل 2501 series ۲۰۰۰) در طول موج ۳۷۰ nm خواندیم (۱۲).

میزان پروتئین هموژن بافت به روش بردفورد اندازه گیری می شود (۱).

www.SID.ir

Archive of SID

مطالعات بافت شناسی: پس از پایان بررسی‌های رفتاری، آزمایش تاییدی بافت شناسی به ترتیب زیر در رابطه با همه گروه‌ها به انجام رسید:

موش‌ها با دوز بالای کتامین (۱۵۰ mg/kg) بطور عمیق بیهوش شده، جهت فیکس کردن مغز حیوان، از روش پرفیوژن ترانس کاردیال استفاده شد. بعد از اتمام پرفیوژن، سر موش‌ها جدا شده و بعد از جدا کردن پوست و ماهیچه‌های ظریف، استخوان جمجمه را از هم جدا و مغز را با دقت خارج کرده و در ظرف‌های محتوی Post Fixative شامل همان محلول فیکساتیو ۴% گذاشته تا جهت بررسی هیستوشیمیایی آماده شود (۱۷-۲).

روش تهیه اسلایدها: در این قسمت از مغزهای آماده شده، بلوک‌های نواحی جسم سیاه و مغز میانی تهیه شد. بلوک‌های مغزی در محلول حاوی بافر فسفات M ۰/۱ و سوکروز ۳۰% به مدت ۳-۲ روز گذاشته شد تا سوکروز به مقدارکافی به داخل نمونه نفوذ کند. سپس نمونه‌ها را خارج کرده و توسط دستگاه Freezing microtom مدل (Cryostat , Leica Germany) در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد، برش هائی به قطر ۴۰μm زده شد. پس از جمع آوری مقاطع در ظرف‌های مخصوص حاوی بافرفسفات M ۰/۱ مولار، مقاطع به کمک قلم موی ظریف، به دقت روی اسلاید (لام)های ژلاتینه قرار داده شده و پس از خشک شدن جهت رنگ آمیزی آماده شدند. در این مرحله ابتدا اسلایدها آبدهی و سپس با رنگ کرزیل ویوله، رنگ آمیزی شدند (۱۷-۲).

شمارش کمی نورون‌ها: توسط میکروسکوپ (Zeiss Germany) در بزرگنمائی ۲۰۰، شمارش نورونی در ناحیه بخش متراکم جسم سیاه (SNc) صورت گرفت. در خصوص شمارش نورونی، این محل در سطوح ۲/۹۶، ۳/۲، ۳/۷، ۴/۲، بر طبق اطلس پاکسینوس و با توجه به مختصات اینتراورال صورت گرفت (۱۷و۲).

تجزیه و تحلیل آماری: در تمام بررسی‌ها داده‌ها به صورت Mean ± SEM نشان داده شده اند. جهت بررسی اختلاف میانگین گروه ها، با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و بخاطر عدم توزیع نرمال داده‌ها از آزمون‌های غیر پارامتری کروسکال والیس، برای بررسی اختلاف بین گروه‌ها و من-ویتنی برای بررسی درون گروه‌ها استفاده شد.

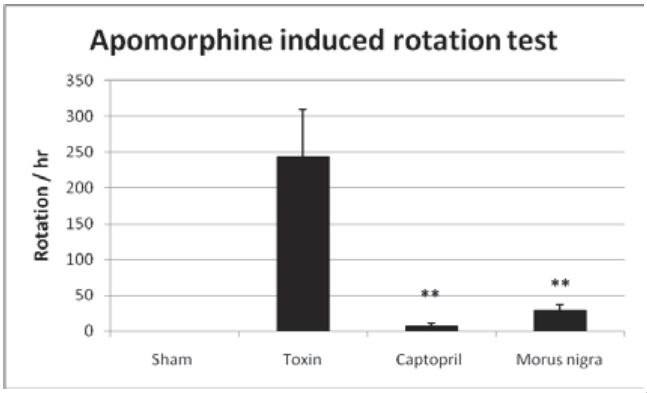
نتایج

تست چرخش القا شده با آپومورفین: در رابطه با تست چرخش، بعد از تزریق آپومورفین، میانگین چرخش با خطای معیار در گروه توکسین (۶۶±۲۴۳) در مقایسه با گروه شاهد (۰±۰)، بیانگر ایجاد ضایعه و تخریب نورون‌های دوپامینرژیک است.

میانگین چرخش در گروه درمان (۸/۳± ۲۹/۳) و در گروه کاپتوپریل (۳/۲± ۷/۵) بوده که در مقایسه با گروه توکسین (۶۶±۲۴۳) تغییر زیاد معنی داری نشان داد (نمودار۱).

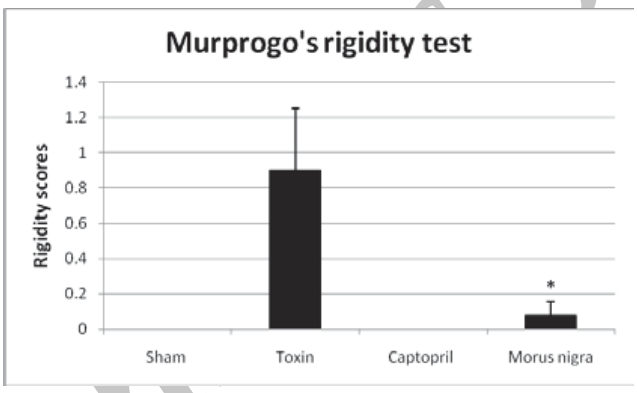
Archive of SID

www.SID.ir



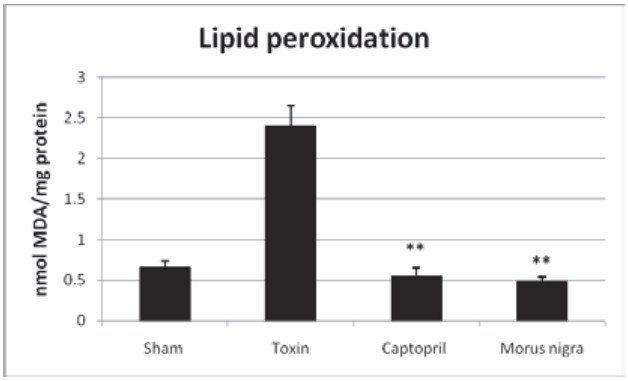
نمودار۱- تست چرخش القا شده با آپومورفین در مقایسه با گروه توکسین ** P <۰/۰۱

تست سفتی عضلانی: میزان سفتی عضلانی در گروه شاهد و کاپتوپریل صفر بوده، این میزان در گروه توکسین (۰/۳۵ ±۰/۹۱) و در گروه درمان (۰/۰۸ ±۰/۰۸۳) بود که بطور معنی داری (p<0/05) در مقایسه با گروه توکسین کمتر است (نمودار۲).



نمودار ۲- تست سفتی عضلانی در مقایسه با گروه توکسین *p <0/05

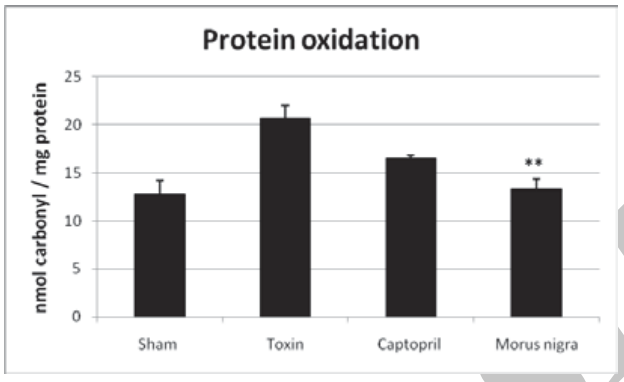
تعیین پراکسیداسیون لیپیدها: میزان پراکسیداسیون لیپیدها در گروه شاهد (۰/۰۸ ±۰/۶۶)، گروه کاپتوپریل (۰/۱۱ ±۰/۵۵) و گروه درمان (۰/۰۵ ±۰/۴۹) کمتر از گروه توکسین (۰/۲۵ ±۲/۴) بود (P <۰/۰۱) (نمودار۳).



نمودار ۳- پراکسیداسیون لیپیدها در مقایسه با گروه توکسین ** P<۰/۰۱

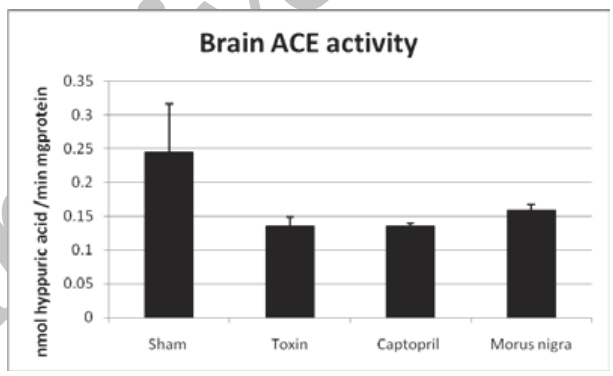
www.SID.ir

بررسی اکسیداسیون پروتئین‌ها: اکسیداسیون پروتئین‌ها در گروه شاهد (۱/۴ ± ۱۲/۸) و در گروه درمان با عصاره آبی برگ شاتوت (۱/۰۶± ۱۳/۳) به طور معنی داری کمتر از گروه توکسین (۱/۳± ۲۰/۷) بود و در گروه کاپتوپریل (۰/۳۴± ۱۶/۵) تفاوت معنی داری نداشت(نمودار۴).



نمودار ۴- اکسیداسیون پروتئین‌ها در مقایسه با گروه توکسین ** P<۰/۰۱

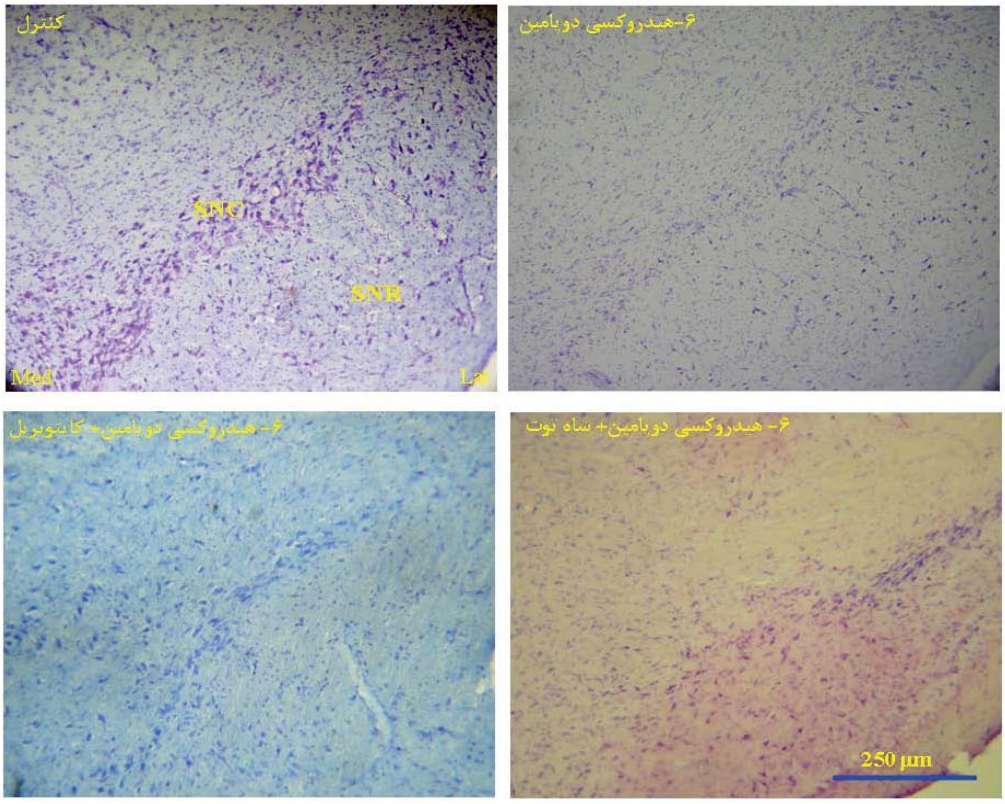
فعالیت آنزیم ACE مغزی: فعالیت آنزیم ACE مغزی در گروه شاهد (۰/۰۷ ± ۰/۲۴)، گروه کاپتوپریل (۰/۰۰۵ ± ۰/۱۳۵) و گروه درمان با عصاره آبی برگ شاتوت (۰/۰۰۹ ± ۰/۱۵۹) نسبت به گروه توکسین (۰/۰۱۴ ± ۰/۱۳۵)، تفاوت معنی داری نشان نداد (نمودار۵).



نمودار۵- فعالیت آنزیم ACE مغزی، فعالیت آنزیم ACE در بافت هموژن مغزی بر اساس نانومول هیپوریک اسید تولید شده در یک دقیقه در دمای ۳۷ ° در هر میلی گرم پروتیین بافت مغز، در گروه‌های مورد آزمایش نشان داده شده است.

بررسی بافت شناسی: در مورد گروه توکسین یک کاهش بارز و شدید در مورد نورون‌های دوپامینرژیک دیده می‌شود و این کاهش در مورد گروه توکسین درمان شده با برگ شاتوت به طور بارزی کمتر است (تصویر۱).

www.SID.ir



تصویر ۱- نورون‌های دوپامینرژیک ناحیه مغز میانی(منطقه جسم سیاه) در گروه‌های شاهد، توکسین و درمان با عصاره (نورون‌های زنده رنگ شده با کرزیل ویوله)،خط مقیاس μm ۲۵۰)

جدول۱- تعداد نورونهای رنگ گرفته به روش رنگ آمیزی نیسل در SNC در دو سمت چپ (ضایعه دیده) و راست مغز

SNC	گروه کنترل	گروه توکسین	گروه درمان با عصاره شاتوت	گروه درمان با کاپتوپریل
سمت چپ مغز	۹/۷ ± ۱۲۴/۵	۱۰/۳ ± ۴۹/۲**	۹/۲ ± ۸۳/۴	۶۹/۴±۷/۶
سمت راست مغز	۸/۹ ± ۱۳۱/۲	۹/۵ ± ۱۲۷/۸	۷/۸ ± ۱۲۱/۸	۱۳۵/۵±۸/۲

** $p<0.01$

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه اثر عصاره آبی برگ شاتوت بر مدل تجربی بیماری پارکینسون ناشی از تزریق ۶- هیدروکسی دوپامین در موش‌های صحرایی نر مورد بررسی قرار گرفت.

از مدت‌ها پیش بیان شد که آسیب اکسیداتیو و تولید رادیکال‌های آزاد خصوصاً گونه‌های رادیکال فعال اکسیژن و نیتریک آکساید باعث از بین رفتن سلول‌های عصبی مغز شده و در برخی بیماری‌ها مثل پارکینسون و آلزایمر این مسئله به‌عنوان یکی از دلایل پیدایش بیماری مطرح است (۲۳). رادیکال‌های آزاد اتم‌های فعال یا قطعات ملکولی شیمیایی هستند که از منابع داخل (اندوژن) و خارج بدن (اگزوژن) ایجاد می‌شوند (۳و۲۲). سلولهای بدن توسط

www.SID.ir

آنتی اکسیدانهای شیمیایی، مثل آنزیمهای سیستم گلوتاتیون، سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز، پراکسی ردوکسین، در مقابل استرس اکسیداتیو تولید شده محافظت می‌شوند (۲۳و ۲۲). در این تحقیق برای تشخیص پارکینسونی بودن حیوان و اثر بخشی داروها در جلوگیری از ایجاد علایم بالینی بیماری، از تست‌های رفتاری سفتی عضلانی و تست چرخش القا شده با آپومورفین استفاده شد. برای بررسی ایجاد استرس اکسیداتیو تستهای پراکسیداسیون لیپیدها و اکسیداسیون پروتئین‌ها که بسیار ناپایدار بوده و تا ۲۴ ساعت بعد از تزریق ۶- هیدروکسی دوپامین به حداکثر می‌رسد و سپس شروع به افت می‌کندانجام گرفت. آنژیوتانسین II باعث تقویت تخریب ایجاد شده بوسیله ۶- هیدروکسی دوپامین، در نورون‌های دوپامینرژیکی می‌شود و مهار کننده‌های ACE یا آنتاگونیست گیرنده AT1 در رت‌هایی که۶ - هیدروکسی دوپامین در ناحیه مغز میانی آن‌ها تزریق شده، مانع از تخریب می‌شوند (۸).

کاپتوپریل به صورت چشمگیری، استرس اکسیداتیو ایجاد شده بوسیله ۶- هیدروکسی دوپامین را کاهش می‌دهد و این مهارکننده ACE، احتمالا ایجاد آسیب‌های اکسیداتیو نورون‌های دوپامینرژیکی و پیشرفت بیماری پارکینسون را کاهش می دهد (۱۲و ۸).

درمان با کاپتوپریل، باعث کاهش در نقص و فقدان نورون‌های دوپامینی جسم سیاه شده، چون اثر این مهار کننده ACE بر آزاد سازی دوپامین و سطوح نوروپپتیدی ۷ روز بعد از درمان مشاهده شده است (۴). بررسی‌های متعدد در رابطه با سلول‌های عصبی و غیر عصبی نشان داده که مهار کننده‌های ACE از طریق جمع آوری ROS و همچنین دارا بودن خواصی که آن‌ها را بر علیه آسیب‌های اکسیداتیو حفظ می‌کند، ممکن است موثر باشد. اثرات حفاظت نورونی و آنتی اکسیدانی ایجاد شده بوسیله درمان با مهارکننده‌های ACE، ممکن است به اثرات بازدارندگی که بر سنتز آنژیوتانسین II دارد، ارتباط داشته باشد. اخیرا نشان داده شده که در چندین نوع سلول از جمله نورون ها، آنژیوتانسین II از طریق گیرنده AT۱ اکسیدازهای وابسته به NADPH را که منبع اصلی داخل سلولی سوپر اکسیدها هستند را فعال می‌کند (۴).

مطالعات اپیدمیولوژیکی آثار مفید مواد غذایی غنی از گیاهان و میوه جات را در کاهش خطر ابتلا به بیماری‌ها از جمله بیماری پارکینسون به اثبات رسانیده است (۱۴).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که عصاره آبی برگ شاتوت به میزان ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم شاخص‌های فعالیت حرکتی را در موش‌های مبتلا به بیماری پارکینسون بهبود می‌دهد. همچنین شاخص‌های پراکسیداسیون لیپیدی و اکسیداسیون پروتئین در گروه عصاره آبی برگ شاتوت نسبت به گروه ۶- هیدروکسی دوپامین کاهش معنی داری را نشان می‌دهد. شاتوت با نام علمی‌های .*Morus nigra* L گیاهی است از تیره Moraceae تست‌های فیتوشیمی انجام شده بر روی عصاره حاصل از این گیاه نشان داد که برگ شاتوت دارای ترپن ها، فلاونوییدها، کومارین ها، روغن‌های فرار مثل ایزو والریک اسید، آلکالوییدها، آمینواسیدهایی مثل اسید گلوتامیک، اسید آسپاراتیک، اسیدهای ارگانیک و پکتین و تانن است (۷و۱۰).

عصاره آبی برگ شاتوت، احتمالا به علت دارا بودن ترکیبات آنتی اکسیدانی و تقویت کنندگی سیستم دفاع آنتی اکسیدان، قادر به کاهش علائم بیماری پارکینسون در مراحل اولیه است. آنتی اکسیدان‌ها و فنول‌های موجود در شاتوت شامل: الاژیک اسید، روتین، گالیک اسید، هیدروکافئیک اسید، پی کوماریک اسید و سینامیک هستند (۱۸).

عصاره آبی برگ شاتوت و کاپتوپریل علیرغم داشتن اثرات مهارکنندگی ACE (۲۴و ۱۲)، در مطالعه حاضر، اثرات مهارکنندگی معنی داری نداشت.

از آنجائیکه دوزهای پیشگیری از این گیاه داروئی توانسته است علائم بیماری پارکینسون مانند سفتی عضلانی را تخفیف دهد و همچنین مارکرهای بیوشیمیایی حاصل از

Archive of SID

www.SID.ir

استرس اکسیداتیو را کم کند و در مطالعات بافتی باعث زنده ماندن تعداد بیشتری از نورونهای دوپامینرژیک جسم سیاه شود، بنابراین می تواند به عنوان یک گیاه داروئی موثر، هدف مطالعات بعدی در درمان بیماری پارکینسون قرار گیرد.

اطلاعات فارماکولوژیک این تحقیق، فرضیه استفاده از عصاره گیاهان را به عنوان داروهای جدید و جایگزین داروهای شیمیایی موجود، در درمان بیماری پارکینسون تقویت می‌کند و تحقیقات آینده باید بر حفاظت نورونی و ظرفیت آنتی اکسیدانی ترکیبات موجود در عصاره این گیاه تمرکز کنند.

References

1. Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry. 1976;72(1):248-54.

2. Burke R, Macaya A, DeVivo D, Kenyon N, Janec E. (1992) Neonatal hypoxic-ischemic or excitotoxic striatal injury results in a decreased adult number of substantia nigra neurons. Neuroscience. 1992;50(3):559-69.

3. Cui K, Luo X, Xu K, Ven Murthy MR. (2004) Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2004 Aug;28(5):771-99.

4. Filomeni G, Graziani I, De Zio D, Dini L, Centonze D, Rotilio G. (2010.) Neuroprotection of kaempferol by autophagy in models of rotenone-mediated acute toxicity: possible implications for Parkinson's disease. Neurobiology of aging.

5. Fujita M, Nishino H, Kumazaki M, Shimada S, Tohyama M, Nishimura T. (1996) Expression of dopamine transporter mRNA and its binding site in fetal nigral cells transplanted into the striatum of 6-OHDA lesioned rat. Brain Res Mol Brain Res. 1996 Jul;39(1-2):127-36.

6. Hirsch AT, Duprez D. (2003) The potential role of angiotensin-converting enzyme inhibition in peripheral arterial disease. Vascular Medicine. 2003;8(4):273-8.

7. Jalikopa S, Kumar R, Bangalore K, Shivashankara K. (1999) Variability in Mulberry (Morus spp.) Accessions for Plant and Fruit Traits and Antioxidant Properties.

8. Jenkins TA, Wong JY, Howells DW, Mendelsohn FA, Chai SY. (1999) Effect of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition on striatal dopamine content in the MPTP-treated mouse. J Neurochem. 1999 Jul;73(1):214-9.

Archive of SID

www.SID.ir

9. Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease(2003) Ann Neurol. 2003;53 Suppl 3:S26-36; discussion S-8.

10. Koyuncu F.(2004) Organic acid composition of native black mulberry fruit. Chemistry of natural compounds. 2004;40(4):367-9.

11. Lee S, Wen J. (2001)A phylogenetic analysis of Prunus and the Amygdaloideae (Rosaceae) using ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. Am J Bot. 2001 Jan;88(1):150-60.

12. Lopez-Real A, Rey P, Soto-Otero R, Mendez-Alvarez E, Labandeira-Garcia JL.(2005) Angiotensin-converting enzyme inhibition reduces oxidative stress and protects dopaminergic neurons in a 6-hydroxydopamine rat model of Parkinsonism. J Neurosci Res. 2005 Sep 15;81(6):865-73.

13. Martin P, Massol J, Puech AJ. (1990) Captopril as an antidepressant? Effects on the learned helplessness paradigm in rats. Biol Psychiatry. 1990 May 1;27(9):968-74.

14. Miyake Y, Sasaki S, Tanaka K, Fukushima W, Kiyohara C, Tsuboi Y. (2010) Dietary fat intake and risk of Parkinson's disease: A case-control study in Japan. Journal of the neurological sciences. 2010;288(1):117-22.

15. Morpurgo C. (1962) Effects of antiparkinson drugs on a phenothiazine-induced catatonic reaction. Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie. 1962;137:84.

16. MOSS J GD. (2005.) The Autonomic Nervous System. Miller's Anesthesia 6th ed Philadelphia, PA: Elsevier Churchill-Livingstone.

17. Muthane U, Ramsay KA, Jiang H, Jackson-Lewis V, Donaldson D, Fernando S.(1994) Differences in nigral neuron number and sensitivity to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57/bl and CD-1 mice. Exp Neurol. 1994 Apr;126(2):195-204.

18. Naderi GA, Asgary S, Sarraf-Zadegan N, Oroojy H, Afshin-Nia F. (2004)Antioxidant activity of three extracts of Morus nigra. Phytother Res. 2004 May;18(5):365-9.

19. Paxinos G. Watson C (1986) The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic.

20. Seet RC, Lee CY, Lim EC, Tan JJ, Quek AM, Chong WL.(2010) Oxidative damage in Parkinson disease: Measurement using accurate biomarkers. Free Radic Biol Med. 2010 Feb 15;48(4):560-6.

21. Tsuda K, Tsuda S, Nishio I, Masuyama Y, Goldstein M. (1998) Captopril inhibits both dopaminergic and cholinergic neurotransmission in the central nervous system. Clin Exp Pharmacol Physiol. 1998 Nov;25(11):904-7.

22. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J.(2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol. 2007;39(1):44-84.

23. Wood-Kaczmar A, Gandhi S, Wood NW. (2006) Understanding the molecular causes of Parkinson's disease. Trends Mol Med. 2006 Nov;12(11):521-8.

24. Ziai SA, Rezazadeh Sh, Dastpak A, Shabestari A, Taghizadeh M, Naghdibadi H.(2006) Study of the ACE Inhibitory Effect of Medicinal Plants Used in Iranian Folk-Medicine as Antihypertensive Remedy. Iranian Journal of Medicinal Plants. 2006;5(20):53-74.

25. Zubenko GS, Nixon RA. (1984) Mood-elevating effect of captopril in depressed patients. Am J Psychiatry. 1984 Jan;141(1):110-1.

Archive of SID

www.SID.ir